

# 当归补血汤通过 PI3K/Akt/Nrf2 通路抑制类风湿关节炎大鼠氧化应激的作用与机制研究

骆美秀<sup>1</sup>, 潘志<sup>2</sup>, 杜连云<sup>2</sup>, 唐录<sup>2</sup>, 王颖航<sup>3\*</sup> (1. 长春中医药大学中西医结合学院, 长春 130117; 2. 长春中医药大学吉林省人参科学研究院, 长春 130117; 3. 长春中医药大学附属医院风湿免疫科, 长春 130021)

**摘要:**目的 研究当归补血汤(Danggui Buxue Decoction, DBD)基于磷脂酰肌醇 3-激酶(phosphatidylinositol 3-kinase, PI3K)/蛋白激酶 B(protein kinase B, Akt)/核因子 E2 相关因子 2(nuclear factor erythroid 2-related factor 2, Nrf2)信号通路调控类风湿关节炎(rheumatoid arthritis, RA)大鼠氧化应激的作用机制。方法 将 48 只 Wistar 大鼠随机分为 6 组[正常组、模型组、雷公藤多苷组(tripterygium glycoside tablets, TGT, 9.45 mg·kg<sup>-1</sup>)、DBD 低剂量组(3.75 g·kg<sup>-1</sup>)、中剂量组(7.5 g·kg<sup>-1</sup>)、高剂量组(15 g·kg<sup>-1</sup>)。除正常组外,其余组均构建胶原诱导性关节炎(collagen-induced arthritis, CIA)大鼠模型,并给予相应药物治疗 28 d。期间定期记录大鼠体重、踝关节肿胀程度,进行关节炎评分;酶联免疫法(ELISA)法测定大鼠血清中超氧化物歧化酶(superoxide dismutase, SOD)、谷胱甘肽过氧化物酶(glutathione peroxidase, GSH-Px)、过氧化氢酶(catalase, CAT)水平及丙二醛(malondialdehyde, MDA)水平;计算脾脏指数、胸腺指数;苏木精-伊红(HE)染色法和番红 O-固绿染色法观察大鼠膝关节滑膜组织病理学形态;qPCR 法测定滑膜组织中 PI3K、Akt、Nrf2、血红素加氧酶 1(HO-1) mRNA 表达量;Western blot 法测定滑膜组织中磷酸化磷脂酰肌醇 3-激酶(p-PI3K)/PI3K、磷酸化蛋白激酶 B(p-Akt)/Akt、Nrf2、HO-1 蛋白表达情况。结果 与正常组相比,模型组大鼠体重偏低( $P < 0.05$ ),双侧后肢明显红肿甚至变形。与模型组比较,各给药组大鼠体重平缓增加( $P < 0.05$ ),双侧后肢肿胀程度明显减轻( $P < 0.05$ ),关节炎评分显著下降( $P < 0.05$ );关节组织中 MDA 水平降低( $P < 0.05$ ),GSH-Px、CAT 含量和 SOD 水平增加( $P < 0.05$ );PI3K/Akt/Nrf2 通路中 PI3K、Akt、Nrf2、HO-1 mRNA 表达升高( $P < 0.05$ );p-PI3K/PI3K、p-Akt/Akt 比值和 Nrf2、HO-1 蛋白表达明显升高( $P < 0.05$ )。结论 DBD 可能通过调控 PI3K/Akt/Nrf2 通路抑制 CIA 大鼠氧化应激水平,减轻滑膜组织氧化损伤,改善滑膜病理变化,从而起到抗 RA 作用。

**关键词:**当归补血汤;类风湿关节炎;氧化应激;PI3K/Akt/Nrf2 信号通路

doi:10.11669/cpj.2024.23.005 中图分类号:R966 文献标志码:A 文章编号:1001-2494(2024)23-2241-08

## Effect and Mechanism of Danggui Buxue Decoction on Oxidative Stress in Rheumatoid Arthritis Rats with PI3K/Akt/Nrf2 Signaling Pathway as the Target

LUO Meixiu<sup>1</sup>, PAN Zhi<sup>2</sup>, DU Lianyun<sup>2</sup>, TANG Lu<sup>2</sup>, WANG Yinghang<sup>3\*</sup> (1. College of Integrative Medicine, Changchun University of Traditional Chinese Medicine, Changchun 130117, China; 2. Jilin Institute of Ginseng Science, Changchun University of Chinese Medicine, Changchun 130117, China; 3. Department of Rheumatology and Immunology, Affiliated Hospital of Changchun University of Traditional Chinese Medicine, Changchun 130021, China)

**ABSTRACT: OBJECTIVE** To investigate the mechanism by which Danggui Buxue Decoction (DBD) regulates oxidative stress in rats with rheumatoid arthritis based on phosphatidylinositol 3-kinase (PI3K)/protein kinase B (Akt)/nuclear factor E2-related factor 2 (Nrf2) signaling pathway. **METHODS** Forty-eight Wistar rats were randomly divided into 6 groups [normal group, model group, tripterygium glycosides tablets group (9.45 mg·kg<sup>-1</sup>), DBD low dose (3.75 g·kg<sup>-1</sup>), medium dose (7.5 g·kg<sup>-1</sup>) and high dose group (15 g·kg<sup>-1</sup>)]. In addition to the normal group, the other groups were constructed collagen-induced arthritis (CIA) rat model, and given the corresponding drug treatment for 28 days. During the period, the body weight of the rats, the degree of ankle swelling, and the arthritis score were recorded regularly. The levels of superoxide dismutase (SOD), glutathione peroxidase (GSH-Px), catalase (CAT) and malondialdehyde (MDA) in serum of rats were determined by ELISA. The spleen index and thymus index were calculated. HE staining and safranin O-fast green staining were used to observe the pathological morphology of synovial membrane of knee joint in rats. The expression of PI3K, Akt, Nrf2 and HO-1 mRNA in synovial tissue was determined by qPCR. The expression of p-PI3K/PI3K, p-Akt/Akt, Nrf2 and HO-1 protein in synovial tissue was determined by Western blot. **RESULTS** Compared with the normal group, the body weight of the rats in the model group was lower ( $P < 0.05$ ), and the bilateral hind limbs were obviously red and swollen or even deformed. Compared with the model group, the body weight of rats in each administration group increased gently

作者简介:骆美秀,女,硕士研究生 研究方向:中西医结合临床内科疾病研究 \*通讯作者:王颖航,女,博士,教授 研究方向:风湿免疫疾病研究 Tel:(0431)86763807

( $P < 0.05$ ), the swelling degree of bilateral hind limbs was significantly reduced ( $P < 0.05$ ), and the arthritis score was significantly decreased ( $P < 0.05$ ). The level of MDA in joint tissue decreased ( $P < 0.05$ ), and the levels of GSH-Px, CAT and SOD increased ( $P < 0.05$ ). The expression of PI3K, Akt, Nrf2 and HO-1 mRNA in PI3K/Akt/Nrf2 pathway was increased ( $P < 0.05$ ). The ratio of p-PI3K/PI3K, p-Akt/Akt and the expression of Nrf2 and HO-1 protein were significantly increased ( $P < 0.05$ ). **CONCLUSION** DBD may inhibit the level of oxidative stress, attenuate the oxidative damage of synovial tissues and improve the pathological changes of synovium by regulating the PI3K/Akt/Nrf2 pathway in CIA rats, thus exerting an anti-RA effect.

**KEY WORDS:** Dangui Buxue Decoction; rheumatoid arthritis; oxidative stress; PI3K/Akt/Nrf2 signaling pathway

类风湿关节炎(rheumatoid arthritis, RA)是一种慢性、自身免疫性疾病,滑膜增生、炎细胞浸润及血管翳生成是其主要病理特征。RA甚至造成关节破坏畸形、部分关节功能丧失等后果,严重影响患者的生活质量<sup>[1]</sup>。近年来RA发病率逐渐上升,全球发病率约0.5%~1%,中国大陆地区发病率约为0.46%<sup>[2]</sup>。迄今为止,RA的发病机制尚未完全明确,尽管非甾体抗炎药、改善病情的抗风湿药和生物制剂在应对RA引发的疼痛和炎症方面已经具有了较为显著的疗效,但由于副作用明显以及成本高等问题,这些药物在临床上的应用仍有诸多限制<sup>[3]</sup>。因此,研发更安全、更有效且成本较低的抗RA药物具有广阔前景。

现代研究表明氧化应激与RA的发生及发展密切相关<sup>[4]</sup>。氧化应激是指由于机体中活性氧(reactive oxygen species, ROS)的过量产生并伴随抗氧化系统能力下降,从而导致机体的氧化和抗氧化之间的失衡状态<sup>[5]</sup>。在RA病程中,氧化应激涉及多种信号通路,其中磷脂酰肌醇-3-激酶(phosphoinositide-3-kinase, PI3K)/蛋白激酶B(protein kinase B, Akt)信号通路是RA病程中对缺氧损伤起保护作用的信号通路,该通路的激活产生抗氧化应激、抑制免疫炎症的生物学效用,并对在RA发病过程中涉及的下游核因子E2相关因子2(nuclear factor erythroid 2-related factor 2, Nrf2)的转录发挥重要调控作用<sup>[6]</sup>。

RA缓解期多属中医学“痹证”范畴的气血虚痹型,由反复发作、迁延不治导致脏腑虚损、气血不足<sup>[7]</sup>。当归补血汤(Dangui Buxue Decoction, DBD),首载于《内外伤辨惑论》,是益气补血的经典方剂。黄芪益卫固表、补气健脾,当归补血活血、养血和营,两药合用具有扶正固本、气血双补的功效<sup>[8]</sup>。目前,DBD对RA的临床疗效已被证实<sup>[9-11]</sup>。研究表明DBD具有调节免疫功能、提高机体抗氧化能力的作用<sup>[12]</sup>。但对于DBD治疗RA的具体作用机制研究较少。本研究建立胶原诱导性关节炎(collagen-induced arthritis, CIA)大鼠模型,以PI3K/Akt/Nrf2信号通路

为基本方向,探讨DBD通过抑制氧化应激从而防治RA的潜在作用机制,旨在为DBD治疗RA的作用机制研究提供一定理论依据及数据支撑。

## 1 材料

### 1.1 实验动物

SPF级雄性Wistar大鼠48只,体质量(180±10)g,购自吉林省长春市亿斯实验动物技术有限责任公司,动物生产许可证号SCXK(吉)2020-0002,饲养于长春中医药大学动物实验中心,自由饮水和进食,温度(23±2)℃,相对湿度(50±5)%。实验经长春中医药大学实验动物伦理委员会批准,批准文号:2024271。

### 1.2 实验药材

雷公藤多苷片(上海复旦复华药业有限公司,国药准字Z31020415,批号:230505);黄芪饮片(河北仁心药业有限公司,批号:28122068)。经河北仁心药业有限公司研究员赵丽霞鉴定为正品。当归饮片(河北康益强药业有限公司,批号:23011601)。经河北康益强药业有限公司研究员赵丽丽鉴定为正品。

### 1.3 实验试剂

牛Ⅱ型胶原(美国Chondrex公司,批号:220563),弗氏完全佐剂(美国Sigma公司,批号:SLCL9648),苏木精-伊红(HE)染色液(长春赛默瑞特科技有限公司,批号:20230302、20230324),番红O-固绿染色液(北京索莱宝科技有限公司,批号:240001001),超氧化物歧化酶(SOD)、丙二醛(MDA)、过氧化氢酶(CAT)、谷胱甘肽过氧化物酶(GSH-Px)检测试剂盒(上海酶联生物科技有限公司,批号:34817B、30239B、30417B、35362B);p-PI3K抗体、PI3K抗体、p-AKT抗体、AKT1抗体、Nrf2抗体、HO-1抗体(ABclonal公司,批号:5500037646、3523022321、5500020007、3522111410、3522080814、3522111422),Goat anti-Rabbit IgG(H&L)-HRP(北京博奥森生物技术有限公司,批号:BA01235136),BCA蛋白浓度测定试剂盒(上海碧云天生物技术公司,批

号:111622230705);ECL 发光液(北京兰杰柯科技有限公司,批号:23328870),总 RNA 提取试剂盒(北京天根生化科技有限公司,批号:A0325A)

#### 1.4 实验仪器

165-8000 电泳仪、170-3930 转膜仪(美国 Bio-Rad 公司);WB 显影仪 Tanon-5200(上海天能生命科学有限公司);3H16RI 高速冷冻离心机(湖南赫西仪器装备有限公司);ETC811 基因扩增仪(Eastwin 公司);石蜡切片机、组织脱水机、石蜡包埋机(德国徕卡仪器有限公司,型号:RM2255、TP1020、EG1150H)。

## 2 方法

### 2.1 DBD 水煎液的制备

按照原方黄芪-当归(5:1)的比例称取适量黄芪和当归,加入 10 倍量蒸馏水浸泡 1 h,加热至沸腾后再煎煮 45 min,过滤。再次加入 5 倍量蒸馏水煎煮滤渣 45 min,再过滤。合并两次滤液,浓缩至生药量  $0.75 \text{ g} \cdot \text{mL}^{-1}$ ,即 DBD 中剂量组水煎液。同法制备  $0.375 \text{ g} \cdot \text{mL}^{-1}$  的 DBD 低剂量组水煎液和  $1.5 \text{ g} \cdot \text{mL}^{-1}$  的 DBD 高剂量组水煎液。

### 2.2 模型建立及给药

参考文献[13]方法,取 40 只大鼠适应性喂养后制备 CIA 模型。初次免疫在大鼠右后足趾皮内注射 0.15 mL 胶原乳剂,第 7 天按相同方法注射 0.1 mL 胶原乳剂进行二次免疫。二次免疫后 7 d,大鼠的脚趾肿胀、关节炎指标均明显升高,提示 CIA 模型建立成功。再将其随机分为模型组、雷公藤多苷组、DBD 低、中、高剂量组。初次免疫后第 14 天开始给药,参照《中国药典》2020 年版黄芪、当归成人服用剂量标准,2 倍量设为临床用量,根据人与大鼠体表面积换算大鼠的等效剂量为 DBD 中剂量为  $7.5 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$ ,设 DBD 低剂量为  $3.75 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$ ,DBD 高剂量  $15 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$ 。根据本课题组前期研究<sup>[14]</sup>,同法换算确定雷公藤多苷的剂量为  $9.45 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ 。各组大鼠按  $10 \text{ mL} \cdot \text{kg}^{-1}$  灌胃给予不同浓度的 DBD 水煎液和雷公藤多苷,每天灌胃 1 次,连续 28 d。正常组和模型组给予等量蒸馏水。

### 2.3 观察指标

**2.3.1 评估大鼠一般情况及踝关节肿胀率** 实验全程观察大鼠的状态和一般行为学表现、关节的肿胀程度等。每周记录 1 次大鼠体质量。于首次免疫之前使用游标卡尺测量大鼠右后踝关节周径,之后每周用相同方法测量一次各组大鼠右后踝关节周

径,计算踝关节肿胀率(公式 1)。

$$\text{足趾肿胀率}(\%) = (\text{致炎后周径} - \text{致炎前足趾周径}) / \text{致炎前足趾周径} \times 100\% \quad \text{公式(1)}$$

**2.3.2 评定大鼠关节炎指数** 大鼠的关节炎程度采用关节炎指数进行评价。在对除正常组的大鼠进行初次免疫前观察一次,之后每周对大鼠的足趾部和关节变化情况及记录一次。采用国际通用 5 级评分标准<sup>[15]</sup>见表 1。

表 1 大鼠关节炎指数的评分标准

Tab. 1 Scoring criteria of arthritis index in rats

| Degree of limb joint lesions  | Joint score |
|---|-------------|
| No skin swelling joint symptoms   | 0 point     |
| Redness of ankles or feet Slight swelling                                   | 1 point     |
| Red ankle and foot slightly swollen   | 2 point     |
| Redness of ankle and foot, moderate swelling of ankle and metatarsal joints | 3 point     |
| The entire ankle, foot and plantar redness and swelling is serious          | 4 point     |

**2.3.3 计算大鼠脾脏指数、胸腺指数** 待末次给药后,用质量分数 20% 氨基甲酸乙酯麻醉大鼠,腹主动脉采集血液完成后处死大鼠并解剖,取出脾和胸腺洗后称重并记录,然后计算脏器指数(公式 2)。

$$\text{脏器指数}(\%) = \text{脏器质量}(\text{g}) / \text{解剖当日大鼠体质量}(\text{g}) \times 100\% \quad \text{公式(2)}$$

### 2.4 关节组织采集

处死大鼠后,取下踝关节和膝关节组织,用生理盐水清洗后,一部分储存在多聚甲醛里,一部分放  $-80 \text{ }^{\circ}\text{C}$  冰箱保存备用。

### 2.5 酶联免疫法(ELISA)法检测血清中氧化应激指标

将“2.3.3”项下取得的血样在室温下  $1400 \text{ g}$  离心 20 min 后取上清,严格按照 ELISA 检测试剂盒说明书检测血清中 CAT、SOD、MDA 及 GSH-Px 的水平。

### 2.6 组织病理学观察

将大鼠膝关节浸泡于体积分数 4% 多聚甲醛中固定 48 h 脱钙、固定。然后依次进行冲水、脱水、透明、浸蜡、包埋、切片等操作,部分切片使用 HE 染色,部分切片使用番红 O-固绿染色,显微镜下观察膝关节滑膜组织病理形态。

**2.7 实时荧光定量 PCR(qPCR)法检测 PI3K、Akt、Nrf2、血红素加氧酶 1(HO-1)mRNA 在大鼠滑膜组织中表达情况**

用总 RNA 提取试剂盒提取大鼠滑膜组织总 RNA。检测其浓度和完整性后,反转录合成 cDNA,

随后准备 1 个 10  $\mu\text{L}$  的反应混合物,包括 0.2  $\mu\text{L}$  的每个上游和下游引物,0.8  $\mu\text{L}$  的目标 DNA,5  $\mu\text{L}$  的 TB Green Premix Ex Taq,并用无核酸酶水补足到 10  $\mu\text{L}$  用于 qPCR 反应。引物由生工生物公司合成,引物序列见表 2, $\beta$ -actin 为内参。

表 2 聚合酶链式反应 (PCR) 引物序列

Tab. 2 PCR primer sequences

| Gene name      | Primer sequences | Primer sequences(5'-3') |
|----------------|------------------|-------------------------|
| PI3K           | Forward primer   | GGCGAAACGCCCATCAAAA     |
|                | Reverse primer   | GACTCCCGTGCATGCATCC     |
| Akt            | Forward primer   | TGTGGATTACCTTATCCCCTCA  |
|                | Reverse primer   | GTTTGGCTTTGGTCTCTGT     |
| Nrf2           | Forward primer   | TCAGCGACGAAAGACTATGA    |
|                | Reverse primer   | CCACTGGTTTCTGACTGGATGT  |
| HO-1           | Forward primer   | ACTTCCCAGAAGAGCTGCAC    |
|                | Reverse primer   | TCTTGCACCTTGTGCTGGC     |
| $\beta$ -actin | Forward primer   | GTCGTACCACTGGCATTGTG    |
|                | Reverse primer   | GTCGTACCACTGGCATTGTG    |

## 2.8 Western blot 法检测 p-PI3K、PI3K、p-Akt、Akt、Nrf2、HO-1 蛋白在大鼠滑膜中的表达情况

用含体积分数 1% 蛋白酶抑制剂 (PMSF) 的 RIPA 裂解液提取各组大鼠滑膜组织总蛋白。BCA 法检测蛋白浓度。等量的待测蛋白经 SDS-聚丙烯酰胺凝胶孔道电泳,在聚偏二氟乙烯膜 (PVDF) 膜上转膜,封闭,于一抗中 4 $^{\circ}\text{C}$  孵育过夜。一抗浓度分别为:p-PI3K (1:1 000)、PI3K (1:2 000)、p-Akt (1:5 000)、Akt (1:1 000)、Nrf2 (1:2 000)、HO-1 (1:1 000)、 $\beta$ -actin (1:1 000)。第二天洗膜后放入提前配制好的二抗 (1:1 000) 中,室温下摇床孵育 1 h 后再次洗膜。用 ECL 试剂显色条带并显影,再利用 Image J 软件进行灰度值计算。以目标蛋白质条带的灰度值与内参  $\beta$ -actin

条带灰度值的比值作为相对表达量。

## 2.9 数据分析

应用 GraphPad Prism 9.5 软件进行数据分析, $P < 0.05$  认为差异有统计学意义。多组间比较采用单因素方差分析 (One-way ANOVA),结果以均  $\bar{x} \pm s$  表示。

## 3 结果

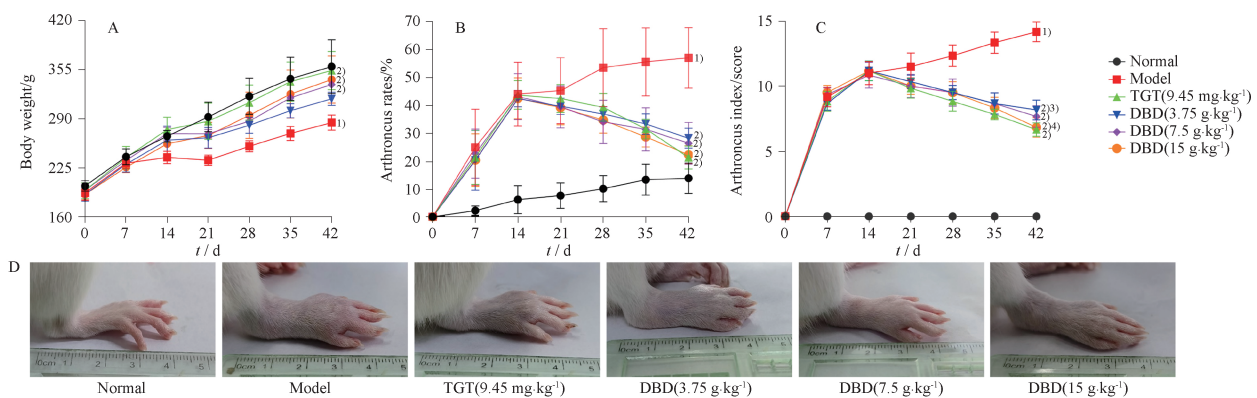
### 3.1 各组大鼠一般情况、体质量、踝关节肿胀率

正常组大鼠始终一般状态良好,精神正常、活动敏捷、饮食正常、体质量持续增加、四肢关节形态正常。模型组大鼠精神萎靡、食量及饮水量减少、体重增长缓慢、关节红肿明显、活动受限甚至跛行。与模型组比较,各给药组大鼠在开始给药后上述情况有不同程度改善,其中雷公藤多苷组和当归补血汤水煎液中、高剂量组体质量平缓增长,表现出明显差异 ( $P < 0.05$ ) (图 1A、D)。

与正常组相比,模型组和其余各给药组大鼠初次免疫后第 7 天开始足关节出现明显红肿症状,且模型组大鼠随着时间延长红肿症状逐渐加重,关节肿胀率升高 ( $P < 0.05$ );与模型组比较,给药 28 d 后雷公藤多苷组明显减轻大鼠的关节红肿、畸形,当归补血汤水煎液各组关节红肿、变形也均有不同程度的减轻,关节肿胀率下降 ( $P < 0.05$ ) (图 1B)。

### 3.2 各组大鼠关节炎评分

与正常组相比,模型组和各治疗组在给药前关节红肿甚至变形,说明造模成功。与模型组比较,各治疗组在给药后关节炎指数均降低,且随着给药时间延长,关节炎指数显著降低 ( $P < 0.05$ ),见图 1C。



A - 体质量趋势图; B - 关节肿胀率趋势图; C - 关节炎评分趋势图; D - 大鼠足爪外观图。与正常组比较,<sup>1)</sup> $P < 0.05$ ;与模型组比较,<sup>2)</sup> $P < 0.05$ ;与雷公藤多苷 (TGT) ( $9.45 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ ) 组比较,<sup>3)</sup> $P < 0.05$ ;与当归补血汤 (DBD) 低剂量组 ( $3.75 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$ ) 比较,<sup>4)</sup> $P < 0.05$ 。

A - body mass trend chart; B - joint swelling rate trend chart; C - arthritis score trend chart; D - appearance of rat paw; <sup>1)</sup> $P < 0.05$ , vs control group; <sup>2)</sup> $P < 0.05$ , vs model group; <sup>3)</sup> $P < 0.05$ , vs TGT ( $9.45 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ ) group; <sup>4)</sup> $P < 0.05$ , vs DBD ( $3.75 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$ ) low dose group.

图 1 各组大鼠体质量、关节肿胀率、关节炎评分变化情况及代表性足爪外观图。 $n = 6, \bar{x} \pm s$

Fig. 1 The changes of body weight, joint swelling rate, arthritis score and representative paw appearance of rats in each group.  $n = 6, \bar{x} \pm s$

### 3.3 各组大鼠胸腺指数和脾脏指数

与正常组比较,模型组大鼠胸腺及脾指数显著升高( $P < 0.05$ );与模型组比较,各治疗组大鼠胸腺和脾脏指数均有不同程度降低( $P < 0.05$ )。这表明 DBD 具有一定的免疫调节作用,见表 3。

### 3.4 各组大鼠血清氧化应激相关指标(SOD、MDA、GSH-Px、CAT)水平比较

与正常组相比,模型组大鼠血清 MDA 显著升高,CAT、SOD、GSH-Px 显著降低( $P < 0.05$ );与模型组比较,雷公藤多苷组和当归补血汤水煎液各组大鼠血清 MDA 显著降低,CAT、SOD、GSH-Px 显著升高( $P < 0.05$ ),见表 4。

**表 4** 酶联免疫法(ELISA)观察各组大鼠血清中过氧化氢酶(CAT)、超氧化物歧化酶(SOD)、丙二醛(MDA)及谷胱甘肽过氧化物酶(GSH-Px)的水平。 $n = 6, \bar{x} \pm s$

**Tab. 4** The levels of catalase CAT, SOD, MDA and GSH-Px in serum of rats in each group were observed by ELISA.  $n = 6, \bar{x} \pm s$

| Group                             | CAT/U · mL <sup>-1</sup>    | SOD/ng · mL <sup>-1</sup>    | MDA/nmol · mL <sup>-1</sup> | GSH-Px/ng · mL <sup>-1</sup> |
|-----------------------------------|-----------------------------|------------------------------|-----------------------------|------------------------------|
| Normal                            | 8.83 ± 0.45                 | 58.21 ± 4.13                 | 6.36 ± 0.23                 | 46.35 ± 3.89                 |
| Model                             | 5.96 ± 0.34 <sup>1)</sup>   | 36.61 ± 0.56 <sup>1)</sup>   | 9.20 ± 0.56 <sup>1)</sup>   | 31.84 ± 0.50 <sup>1)</sup>   |
| TGT (9.45 mg · kg <sup>-1</sup> ) | 7.38 ± 0.15 <sup>2)</sup>   | 48.89 ± 2.76 <sup>2)</sup>   | 6.88 ± 0.06 <sup>2)</sup>   | 39.06 ± 0.41 <sup>2)</sup>   |
| DBD (3.75 g · kg <sup>-1</sup> )  | 6.46 ± 0.07 <sup>2)3)</sup> | 40.94 ± 0.90 <sup>2)3)</sup> | 7.90 ± 0.36 <sup>2)3)</sup> | 35.10 ± 0.67 <sup>2)</sup>   |
| DBD (7.5 g · kg <sup>-1</sup> )   | 6.75 ± 0.09 <sup>2)3)</sup> | 44.52 ± 1.09 <sup>2)3)</sup> | 7.72 ± 0.13 <sup>2)3)</sup> | 37.72 ± 0.63 <sup>2)</sup>   |
| DBD (15 g · kg <sup>-1</sup> )    | 7.05 ± 0.07 <sup>2)4)</sup> | 44.56 ± 1.10 <sup>2)</sup>   | 7.37 ± 0.12 <sup>2)</sup>   | 40.57 ± 0.55 <sup>2)4)</sup> |

注:与正常组比较,<sup>1)</sup> $P < 0.05$ ;与模型组比较,<sup>2)</sup> $P < 0.05$ ;与 TGT 组(9.45 mg · kg<sup>-1</sup>)比较,<sup>3)</sup> $P < 0.05$ ;与 DBD 低剂量组(3.75 g · kg<sup>-1</sup>)比较,<sup>4)</sup> $P < 0.05$ 。

Note: <sup>1)</sup> $P < 0.05$ , vs control group; <sup>2)</sup> $P < 0.05$ , vs model group; <sup>3)</sup> $P < 0.05$ , vs TGT (9.45 mg · kg<sup>-1</sup>) group; <sup>4)</sup> $P < 0.05$ , vs DBD low dose(3.75 g · kg<sup>-1</sup>) group.

### 3.5 各组大鼠膝关节组织病理变化情况

HE 染色结果显示,正常组大鼠关节结构正常,滑膜细胞排列规律、无滑膜增生,未见炎性细胞浸润及血管翳。与正常组比较,模型组大鼠关节滑膜细胞排列杂乱无序、异常增殖,炎性细胞浸润明显、有血管翳形成。与模型组比较,各给药组不同程度改善了大鼠滑膜组织病理改变,炎性细胞浸润、血管翳生成均减少,见图 2A。

番红 O-固绿染色结果显示,正常组大鼠关节软骨与番红 O 结合呈均匀红色,软骨结构完整,细胞形态正常,骨组织同固绿结合呈绿色或蓝色。与正常组比较,模型组大鼠关节软骨严重受损,导致番红 O 淡染或不着色,软骨基质减少,软骨细胞簇集,排列紊乱。与模型组比较,各给药组不同程度减轻了软骨病变,软骨面较平整,软骨细胞排列较规整,见图 2B。

### 3.6 各组大鼠滑膜组织中 PI3K、Akt、Nrf2、HO-1mRNA 表达情况

与正常组比较,模型组大鼠滑膜组织中 PI3K、Akt、Nrf2、HO-1mRNA 表达显著降低( $P < 0.05$ );与模型组比较,雷公藤多苷组和当归补血汤水煎液各

**表 3** 当归补血汤(DBD)对类风湿关节炎(RA)大鼠胸腺指数和脾脏指数的影响。 $n = 6, \bar{x} \pm s$

**Tab. 3** Effects of DBD on thymus index and spleen index in rats with RA.  $n = 6, \bar{x} \pm s$

| Group                             | Thymus index              | Spleen index                |
|-----------------------------------|---------------------------|-----------------------------|
| Normal                            | 0.11 ± 0.02               | 0.13 ± 0.01                 |
| Model                             | 0.14 ± 0.02 <sup>1)</sup> | 0.21 ± 0.03 <sup>1)</sup>   |
| TGT (9.45 mg · kg <sup>-1</sup> ) | 0.09 ± 0.02 <sup>2)</sup> | 0.15 ± 0.02 <sup>2)</sup>   |
| DBD (3.75 g · kg <sup>-1</sup> )  | 0.12 ± 0.01 <sup>2)</sup> | 0.19 ± 0.01 <sup>2)3)</sup> |
| DBD (7.5 g · kg <sup>-1</sup> )   | 0.11 ± 0.01 <sup>2)</sup> | 0.17 ± 0.02 <sup>2)4)</sup> |
| DBD (15 g · kg <sup>-1</sup> )    | 0.10 ± 0.01 <sup>2)</sup> | 0.14 ± 0.02 <sup>2)4)</sup> |

注:与正常组比较,<sup>1)</sup> $P < 0.05$ ;与模型组比较,<sup>2)</sup> $P < 0.05$ ;与 TGT 组(9.45 mg · kg<sup>-1</sup>)比较,<sup>3)</sup> $P < 0.05$ ;与 DBD 低剂量组(3.75 g · kg<sup>-1</sup>)比较,<sup>4)</sup> $P < 0.05$ 。

Note: <sup>1)</sup> $P < 0.05$ , vs control group; <sup>2)</sup> $P < 0.05$ , vs model group; <sup>3)</sup> $P < 0.05$ , vs TGT (9.45 mg · kg<sup>-1</sup>) group; <sup>4)</sup> $P < 0.05$ , vs DBD (3.75 g · kg<sup>-1</sup>) low dose group.

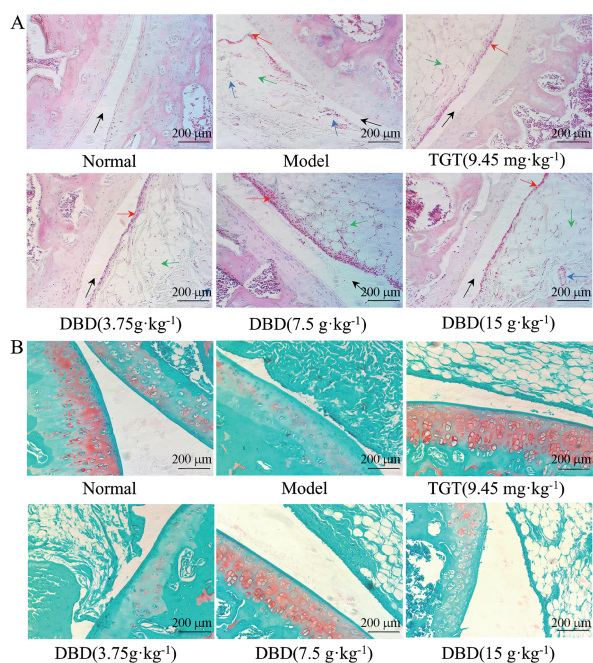
组大鼠滑膜组织中 PI3K、Akt、Nrf2、HO-1mRNA 表达有不同程度升高( $P < 0.05$ ),见表 5。

### 3.7 各组大鼠滑膜组织 p-PI3K、PI3K、p-Akt、Akt、Nrf2、HO-1 蛋白水平

与正常组相比,模型组大鼠滑膜组织中 p-PI3K/PI3K、p-Akt/Akt 比值降低,Nrf2、HO-1 蛋白水平显著降低( $P < 0.05$ );与模型组比较,雷公藤多苷组和当归补血汤水煎液各组大鼠滑膜组织中 p-PI3K/PI3K、p-Akt/Akt 比值和 Nrf2、HO-1 蛋白水平明显升高( $P < 0.05$ ),见图 3。

## 4 讨论

RA 是一种慢性自身免疫性疾病,病变主要集中在关节部位,表现为关节软骨的进行性破坏<sup>[17]</sup>。氧化应激已被证明是参与 RA 疾病发生、发展的关键因素之一。在 RA 病程中,自身免疫与内源性或外源性抗原之间的相互作用可诱导 ROS 等自由基的过度产生,过多的自由基会使机体氧化与抗氧化系统失衡并升高机体氧化应激水平,从而对机体造成更大的损伤<sup>[18]</sup>。SOD、CAT、GSH-Px 是体内重要的抗氧化酶,其水平可间接反映机体抗氧化能力



A - HE 染色; 黑色箭头 - 关节腔; 红色箭头 - 炎细胞浸润; 绿色箭头 - 成纤维细胞; 蓝色箭头 - 血管翳; B - 番红 O-固绿染色。

A - HE staining; black arrow - articular cavity; red arrow - inflammatory cell infiltration; green arrow - fibroblasts; blue arrow - pannus; B - safranin O-fast green staining.

图2 苏木精-伊红(HE)染色、番红 O-固绿染色观察各组大鼠膝关节病理改变(×200)

Fig. 2 The pathological changes of knee joint in each group were observed by hematoxylin-eosin staining and safranin O-fast green staining(×200)

表5 DBD 对 RA 大鼠滑膜组织中磷脂酰肌醇 3-激酶(PI3K)、蛋白激酶 B(Akt)、核因子 E2 相关因子 2(Nrf2)、血红素加氧酶 1(HO-1) mRNA 表达的影响。n = 3,  $\bar{x} \pm s$

Tab. 5 Effects of DBD on mRNA expression of PI3K, Akt, Nrf2 and HO-1 in synovial tissue of rats with RA. n = 3,  $\bar{x} \pm s$

| Group                             | PI3K                          | AKT                       | Nrf2                      | HO-1                        |
|-----------------------------------|-------------------------------|---------------------------|---------------------------|-----------------------------|
| Normal                            | 1.98 ± 0.03                   | 1.40 ± 0.15               | 1.43 ± 0.11               | 2.28 ± 0.08                 |
| Model                             | 1.43 ± 0.07 <sup>1)</sup>     | 0.50 ± 0.10 <sup>1)</sup> | 0.96 ± 0.06 <sup>1)</sup> | 1.29 ± 0.09 <sup>1)</sup>   |
| TGT (9.45 mg · kg <sup>-1</sup> ) | 1.65 ± 0.05 <sup>2)</sup>     | 1.12 ± 0.10 <sup>2)</sup> | 1.38 ± 0.09 <sup>2)</sup> | 2.01 ± 0.18 <sup>2)</sup>   |
| DBD (3.75 g · kg <sup>-1</sup> )  | 1.25 ± 0.05 <sup>2)3)4)</sup> | 0.88 ± 0.09 <sup>2)</sup> | 1.24 ± 0.05 <sup>2)</sup> | 1.63 ± 0.04 <sup>2)3)</sup> |
| DBD (7.5 g · kg <sup>-1</sup> )   | 1.59 ± 0.04 <sup>2)4)</sup>   | 1.00 ± 0.09 <sup>2)</sup> | 1.28 ± 0.06 <sup>2)</sup> | 1.92 ± 0.04 <sup>2)</sup>   |
| DBD (15 g · kg <sup>-1</sup> )    | 1.72 ± 0.03 <sup>2)3)</sup>   | 1.20 ± 0.11 <sup>2)</sup> | 1.35 ± 0.08 <sup>2)</sup> | 2.00 ± 0.11 <sup>2)4)</sup> |

注:与正常组比较,<sup>1)</sup>P < 0.05;与模型组比较,<sup>2)</sup>P < 0.05;与 TGT 组(9.45 mg · kg<sup>-1</sup>)比较,<sup>3)</sup>P < 0.05;与 DBD 低剂量(3.75 g · kg<sup>-1</sup>)组比较,<sup>4)</sup>P < 0.05。

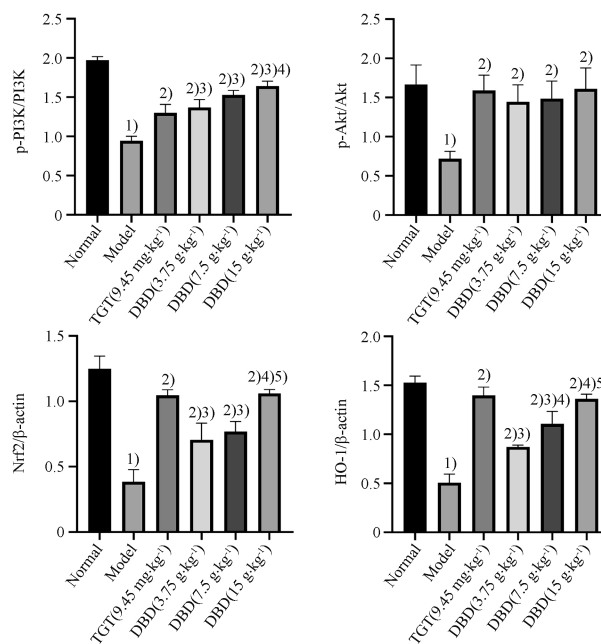
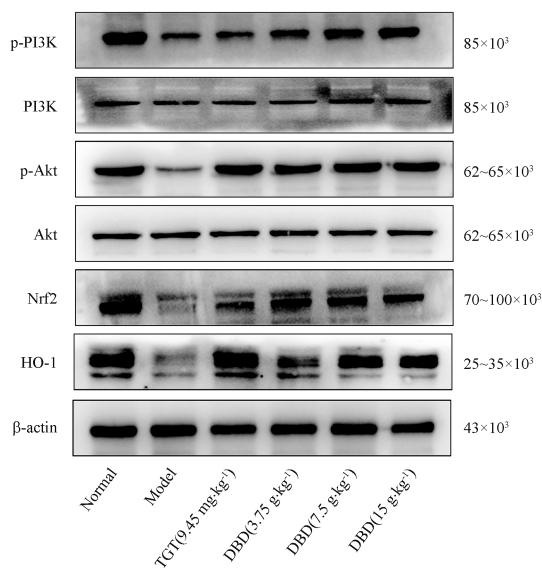
Note: <sup>1)</sup>P < 0.05, vs control group; <sup>2)</sup>P < 0.05, vs model group; <sup>3)</sup>P < 0.05, vs TGT (9.45 mg · kg<sup>-1</sup>) group; <sup>4)</sup>P < 0.05, vs DBD low dose(3.75 g · kg<sup>-1</sup>) group

在 RA 的氧化应激状态下,PI3K/Akt/Nrf2 信号通路主要起到维护细胞稳态、减轻氧化损伤等作用。近年有研究发现,氧化应激过度发生时机体的抗氧化功能下降,可能伴随着 Nrf2 表达下调,并与 PI3K/Akt 信号通路的磷酸化被抑制有关,这会导致 Akt 活性降低,进而影响 Nrf2 及其下游抗氧化基因 HO-1 的表达<sup>[30]</sup>。PI3K 可被受体酪氨酸激酶(RTKs)和 G 蛋白偶联受体(GPCR)激活,激活后的 PI3K 可催化

的强弱<sup>[19]</sup>。脂质过氧化的产物 MDA 反映机体氧自由基代谢水平,据其可推断机体的氧化应激水平变化<sup>[20]</sup>。有研究显示 RA 患者血清中,MDA 含量显著升高,SOD、GSH-Px 等含量明显降低,表现为氧化应激状态<sup>[21]</sup>。因此,降低氧化应激水平,提高机体抗氧化能力对 RA 的治疗具有重要意义。

中医认为 RA 由于营卫失调,致气血俱虚,使外邪有可乘之机<sup>[22]</sup>。DBD 具有气血双补的功效。目前,临床上用 DBD 治疗 RA 已取得成效。《古今名医临证实录丛书·痹证》中治疗“痹证”的用药规律研究发现其常用方多在 DBD 等方的基础上化裁<sup>[23]</sup>。Luo 等<sup>[24]</sup>用 DBD 治疗中老年女性 RA 扶正气以助祛邪,临床疗效颇好。另有研究认为<sup>[9]</sup>,DBD 气血双补而不壅遏病邪,具有补而不腻的特点,可作为 RA 缓解期反复发作的首选。Guo 等<sup>[25]</sup>对 3 种风湿病关节炎处方用药规律的比较发现核心处方之一为 DBD 加减。现代药理学研究表明 DBD 具有抗氧化应激的作用<sup>[26-28]</sup>。Gong 等<sup>[29]</sup>研究证明 DBD 中的抗氧化活性是由当归主要活性成分阿魏酸所介导。但对于 DBD 抑制 RA 中的氧化应激水平异常增高的作用机制仍有待进一步研究。课题组前期研究表明 RA 的发病及发展主要涉及 PI3K/Akt 等信号通路<sup>[14]</sup>,提示调控 PI3K/Akt/Nrf2 信号通路可能成为 DBD 改善 RA 氧化应激状态的关键机制之一。

细胞膜磷脂的 PI-4,5-二磷酸(PIP2)转化为 PI-3,4,5-三磷酸(PIP3),PIP3 将 PIP3 依赖性激酶-1(PDK1)活化并使其定位于细胞膜上进而催化 Akt 发生磷酸化,Akt 在特定位点上完成激活并通过调节下游靶基因而发挥作用<sup>[31]</sup>。研究表明,Nrf2 是 PI3K 途径的下游靶点,在诱导内源性抗氧化酶抗氧化应激过程中处于枢纽地位<sup>[32]</sup>。当氧化应激刺激机体,PI3K 等蛋白激酶可直接磷酸化 Nrf2,



与正常组比较,<sup>1)</sup> $P < 0.05$ ;与模型组比较,<sup>2)</sup> $P < 0.05$ ;与TGT组( $9.45 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ )比较,<sup>3)</sup> $P < 0.05$ ;与DBD低剂量组( $3.75 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$ )比较,<sup>4)</sup> $P < 0.05$ ;与DBD中剂量组( $7.5 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$ )比较,<sup>5)</sup> $P < 0.05$ 。

<sup>1)</sup> $P < 0.05$ , vs control group; <sup>2)</sup> $P < 0.05$ , vs model group; <sup>3)</sup> $P < 0.05$ , vs TGT ( $9.45 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ ) group; <sup>4)</sup> $P < 0.05$ , vs DBD low dose ( $3.75 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$ ) group; <sup>5)</sup> $P < 0.05$ , vs DBD medium dose ( $7.5 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$ ) group.

**图3** DBD对RA大鼠滑膜组织中磷酸化磷脂酰肌醇3-激酶(p-PI3K)、PI3K、磷酸化蛋白激酶B(p-Akt)、Akt、Nrf2、HO-1信号通路蛋白表达的影响。 $n = 3, \bar{x} \pm s$

**Fig. 3** Effect of DBD on protein expression of p-PI3K, PI3K, p-Akt, Akt, Nrf2 and HO-1 signaling pathway in synovial tissue of rats with RA.  $n = 3, \bar{x} \pm s$

综上,DBD可通过抑制氧化应激减轻RA的关节损伤。其机制可能与激活PI3K/Akt/Nrf2信号通路有关。本研究丰富了DBD治疗RA的作用机制,但没有使用RA经典治疗通路的相关抑制剂以排除这些通路对治疗效果的影响是本实验的不足之处,后续研究可从此角度深入开展,以明确DBD对RA氧化应激状态的具体分子机制。

## REFERENCES

- [ 1 ] SCHERER H U, HÄUPL T, BURMESTER G R. The etiology of rheumatoid arthritis[J]. *J Autoimmun*, 2020, 110: 102400.
- [ 2 ] ALMUTAIRI K, NOSSENT J, PREEN D, et al. The global prevalence of rheumatoid arthritis: a meta-analysis based on a systematic review[J]. *Rheumatol Int*, 2021, 41(5): 863-877.
- [ 3 ] FRAZZEI G, MUSTERS A, DE VRIES N, et al. Prevention of rheumatoid arthritis: a systematic literature review of preventive strategies in at-risk individuals[J]. *Autoimmun Rev*, 2023, 22(1): 103217.
- [ 4 ] ZAMUDIO-CUEVAS Y, MARTÍNEZ-FLORES K, MARTÍNEZ-NAVA G A, et al. Rheumatoid arthritis and oxidative stress[J]. *Cell Mol Biol Noisy-le-grand*, 2022, 68(6): 174-184.
- [ 5 ] PHULL A R, NASIR B, HAQ I U, et al. Oxidative stress, consequences and ROS mediated cellular signaling in rheumatoid arthritis[J]. *Chem Biol Interact*, 2018, 281: 121-136.
- [ 6 ] D'AMICO R, GUGLIANDOLO E, CORDARO M, et al. Toxic

Effects of Endocrine Disruptor Exposure on Collagen-Induced Arthritis[J]. *Biomolecules*, 2022, 12(4): 564.

- [ 7 ] WU Y N, LIU S Q. Research progress of rheumatoid arthritis treated with Traditional Chinese and Western Medicine[J]. *Pract Chin J Inter Med* (实用中医内科学杂志), 2022, 36(3): 72-75.
- [ 8 ] HU J, LI K, LI A P, et al. Research progress on material basis of Danggui Buxue Decoction[J]. *Chin Tradit Herb Drugs* (中草药), 2020, 51(21): 5658-5663.
- [ 9 ] WANG H Y, SONG S L. Application of Danggui Buxue Decoction in Rheumatic Diseases[J]. *J Liaoning Univ Tradit Chin Med* (辽宁中医药大学学报), 2012, 14(1): 184-185.
- [ 10 ] LIANG M R. Curative effect observation of Danggui Buxue Decoction and Guizhi Decoction in the treatment of rheumatoid arthritis[J]. *Cardiov Dis Elec J Integr Tradit Chin West Med* (中西医结合心血管病电子杂志), 2017, 5(20): 14.
- [ 11 ] YUAN P W, YANG W, KANG W L, et al. Clinical Thought of LI Kanyin Using Astragalus[J]. *Liaoning J Tradit Chin Med* (辽宁中医杂志), 2016, 43(3): 491-493.
- [ 12 ] ZHOU J, SHI P, MA R, et al. Notopterol inhibits the NF- $\kappa$ B pathway and activates the PI3K/Akt/Nrf2 pathway in periodontal tissue[J]. *J Immunol*, 2023, 211(10): 1516-1525.
- [ 13 ] YANG Y J, LU L J, WANG J J, et al. Tubson-2 decoction ameliorates rheumatoid arthritis complicated with osteoporosis in CIA rats involving isochlorogenic acid A regulating IL-17/MAPK pathway[J]. *Phytomedicine*, 2023, 116: 154875.
- [ 14 ] ZHAO Y, ZHENG Q H, ZHANG Z, et al. Interventional effect and network pharmacological study of Dnaggiu Buxue Decoction on Rheumatoid Arthritis[J]. *New Chin Med Clin Pharm* (中药

- 新药与临床药理), 2023, 34(5): 654-662.
- [15] KAIHARA K, NAKAGAWA S, ARAI Y, *et al.* Sustained hypoxia suppresses joint destruction in a rat model of rheumatoid arthritis via negative feedback of hypoxia inducible factor-1 $\alpha$ [J]. *Int J Mol Sci*, 2021; 22(8): 3898.
- [16] WANG Z R, LI M, ZHANG Z Q, *et al.* Preparation of tripterygium glycosides nanoparticles and therapeutic effect on arthritis rats [J]. *Chin Pharmacol Bull*(中国药理学通报), 2024, 40(1): 125-132.
- [17] GRAVALLESE E M, FIRESTEIN G S, KOSCAL N, *et al.* What Is Rheumatoid Arthritis? [J]. *N Engl J Med*, 2024, 390(13): e32.
- [18] KAUR G, SHARMA A, BHATNAGAR A. Role of oxidative stress in pathophysiology of rheumatoid arthritis: insights into NRF2-KEAP1 signalling[J]. *Autoimmunity*, 2021, 54(7): 385-397.
- [19] SUN Y Q, LIU J, ZHOU Q, *et al.* Expression of LINC00638 in rheumatoid arthritis patients with damp-heat obstruction syndrome and the regulatory mechanisms for inflammation and oxidative stress[J]. *J Cent South Univ Med Ed*(中南大学学报 医学版), 2022, 47(2): 183-193.
- [20] ZHANG Y P. Curative Effect of Wenjing Juanbi Tang Combined with Western Medicine for Rheumatoid Arthritis with Cold-Dampness Obstruction Syndrome and Its Regulating Effect on Oxidative Stress[J]. *New Chin Med* (新中医), 2021, 53(15): 91-95.
- [21] KOLAH S, MIRTAHERI E, POURGHASEM GARGARI B, *et al.* Oral administration of alpha-lipoic acid did not affect lipid peroxidation and antioxidant biomarkers in rheumatoid arthritis patients[J]. *Int J Vitam Nutr Res*, 2019, 89(1/2): 13-21.
- [22] ZHANG C F, SONG C Z, HAN J L, *et al.* Effect of sanbi granules on TLR4/MAPKs/NF-KB signal pathway in type II collagen induced arthritis rats[J]. *Chin Pharm J* (中国药学杂志), 2020, 55(7): 519-526.
- [23] YU Y F, YANG X Y, WEI F M, *et al.* Research research on medication rules of Gujin Mingyi Linzheng Shilu Gongshu · Bizheng in the treatment of arthralgia syndrome[J]. *Res Pract Chin Med*(现代中药研究与实践), 2022, 36(1): 72-75.
- [24] LUO C G, JIANG Q, TANG X P. Professor Lu Zhizheng's Experience in treating Rheumatoid Arthritis with partner-drug [J]. *World J Integr Med* (世界中西医结合杂志), 2021, 16(6): 1013-1016.
- [25] GUO J C, WANG J, ZHOU Q, *et al.* Comparison of medication rules of three kinds of rheumatoid arthritis prescriptions[J]. *Chin Pat Med* (中成药), 2021, 43(6): 1583-1588.
- [26] WANG W Y, LIU S, LV Q, *et al.* Research progress on pharmacological effect of Astragali Radix-Angelicae Sinensis Radix on invigorating Qi and Activating Blood[J]. *Chin J Exp Tradit Med Form* (中国实验方剂学杂志), 2021, 27(6): 207-216.
- [27] GAO Y, ZHANG Y, LIU W, *et al.* Danggui Buxue decoction alleviates cyclophosphamide-induced myelosuppression by regulating  $\beta$ -hydroxybutyric acid metabolism and suppressing oxidative stress[J]. *Pharm Biol*, 2023, 61(1): 710-721.
- [28] LI D, SI J, GUO Y, *et al.* Danggui-Buxue decoction alleviated vascular senescence in mice exposed to chronic intermittent hypoxia through activating the Nrf2/HO-1 pathway[J]. *Pharm Biol*, 2023, 61(1): 1041-1053.
- [29] GONG A G, HUANG V Y, WANG H Y, *et al.* Ferulic Acid Orchestrates Anti-Oxidative Properties of Danggui Buxue Tang, an Ancient Herbal Decoction: Elucidation by Chemical Knock-Out Approach[J]. *PLoS One*, 2016, 11(11): e0165486.
- [30] ZOU Y P, ZHANG Q C, ZHANG Q Y, *et al.* Procyanidin B2 alleviates oxidative stress-induced nucleus pulposus cells apoptosis through upregulating Nrf2 via PI3K-Akt pathway[J]. *J Orthop Res*, 2023, 41(7): 1555-1564.
- [31] LIU C, HE L, WANG J, *et al.* Anti-angiogenic effect of Shikonin in rheumatoid arthritis by downregulating PI3K/AKT and MAPKs signaling pathways[J]. *J Ethnopharmacol*, 2020, 260: 113039.
- [32] PAN W, MIAO L, LIN Y, *et al.* Regulation mechanism of oxidative stress induced by high glucose through PI3K/Akt/Nrf2 pathway in juvenile blunt snout bream (*Megalobrama amblycephala*) [J]. *Fish Shellfish Immunol*, 2017, 70: 66-75.
- [33] HE S, GUO Y, ZHAO J, *et al.* Ferulic acid protects against heat stress-induced intestinal epithelial barrier dysfunction in IEC-6 cells via the PI3K/Akt-mediated Nrf2/HO-1 signaling pathway [J]. *Int J Hyperth*, 2019, 35(1): 112-121.
- [34] HU S, WU Y, ZHAO B, *et al.* Panax notoginseng saponins protect cerebral microvascular endothelial cells against oxygen-glucose deprivation/reperfusion-induced barrier dysfunction via activation of PI3K/Akt/Nrf2 antioxidant signaling pathway[J]. *Molecules*, 2018, 23(11): 2781.

(收稿日期:2024-05-24)